

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

[0001]

[Background of the Invention]

The specific activity pharmacologically oral compound of drugs is the target of decomposition and unsuitable absorption following administration to the mammals. The trial for improving the stability and the bioavailability of activity drugs which were administered orally has been made. For example, a liposome and micell have been used as a drug carrier. For example, refer to US,5,552,156,B to Burke, and US,4,837,028,B to Allen. US,4,849,227,B to Cho is indicating the constituent for internal use containing the particles which consist of an emulsifier and a surface-active agent.

Activity drugs are combined with the surface of these particles here, and this particle is covered with the lipid film.

US,5,665,700,B to Cho and others is indicating the compound containing the hydrophilic phase containing bioactive material.

It distributes in a lipophilic phase and this hydrophilic phase forms an emulsion here. US,5,858,398,B to Cho is indicating the particles of activity drugs, phospholipid, and the compound containing a surface-active agent.

These particles are suspended to micell here.

[Background of the Invention]

[0002]

US,4,615,885,B to Nakagame and others is indicating the liposome preparation things containing urokinase and higher fatty acid, a polyalkylene glycol, and calcium. Nakagame and others is indicating incorporating higher fatty acid into liposomal membrane by the concentration that phospholipid remains into lamella structure. The fatty acid concentration in this film is 5 weight % - 15 weight % preferably. More, at high concentration, formation of the micell which has this fatty acid at the center is brought about as a result, and the capability for this to carry this drug of said constituent according to Nakagame and others will be reduced or removed.

[0003]

Although micell is known as a drug delivery system, generally it is unstable and separation from this micell of these activity drugs is brought about as a result. The trial which promotes the absorption from the intestines of the insulin and other giant molecules by applying a surface-active agent, triglyceride, and lipid-surface-active agent mixed micelle has brought a result which is generally poor. Muranishi et al. (1978) J. Pharm. Dyn. 1: 28; Inouye et al. (1979) J. Pharm. Dyn. 2: 286; Danforth et al. J. Pharm. (1980). Dyn. 4 : 219; Crane et al. (1968) Diabetes 17: 625.

[0004]

US,5,858,398,B is indicating stabilization of the micell by addition of hydrophilic cholesterol in in vitro, and phospholipid.

[0005]

According to this invention, C₁₂ of activity drugs - encapsulation in C₁₈ fatty acid layer formed pro micell pharmacologically, and it was discovered that this provides stable micell on the occasion of administration to the mammals. This pro micell sends these activity pharmacologically drugs effectively, and does not need stabilization with cholesterol and phospholipid in in vitro.

[Description of the Invention]

[Problem to be solved by the invention]

[0006]

[Summary of the Invention]

As for this invention, the constituent which was encapsulated in the film of C₁₂ - C₁₈ fatty acid and which is pharmacologically encapsulated in a gelatine capsule still more optionally including activity drugs is provided. In mammalian intestines, exposure to C₁₂ - C₁₈ fatty acid brings about in vivo formation of the stable micell which sends activity drugs effectively into general circulation pharmacologically as a result. This invention provides the method of manufacturing and using such a constituent further.

[Means for solving problem]

[0007]

[DETAILED DESCRIPTION]

As for this invention, the pharmacological composition by which the encapsulation was carried out into the film of esterification C₁₂ - C₁₈ fatty acid and by which an encapsulation is pharmacologically carried out still more optionally into a gelatine capsule including activity drugs is provided. Fatty acid exists with less than 15 weight % of sum density among this constituent, in order to make it this constituent be in the form of "pro micell." Although the term pro micell used in this Description is insufficient for forming micell, when exposed to fatty acid in a mammalian digestive system, the constituent which has C₁₂ of concentration with the capability to form micell - C₁₈ fatty acid is meant. In particular, on the occasion of administration to the mammals, this pro micell is exposed to fatty acid within intestines so that the whole fatty acid product percentage may exceed 15%, and this pro micell forms micell.

[0008]

in By forming micell from the pro micell of this invention by vivo, delivery to the general circulation of these activity pharmacologically drugs is provided. The drugs which have micell are easily absorbed by the parenteral-absorption system via a monoglyceride course, and the drugs in the arbitrary pro micell which is still liposome forms on the other hand are absorbed via a phosphate system. According to this invention, the insulin sent by internal use with the form of pro micell, It is found out in the lymph discharged by the duodenum (a liposome and US,5,665,700,B of US,5,656,289,B are the same as that of a micro emulsion), And it was found out in the portal vein blood which flows in into liver (US,5,858,398,B is the same as that of stabilizing agent micell). Therefore, delivery is the same as that of what is observed in the case of insulin injection. An insulin is sent to liver with the compound of this invention so that the proinsulin by which internal secretion was just especially carried out from the beta cell of the pancreas may be sent.

[0009]

Pharmacologically, activity drugs are not limited to these, although it includes other known materials in this industry peptide, glycoprotein, organicity and to Inorganic Chemistry Division be the substance, to be a herb, and that it is pharmacologically useful as activity drugs. Especially the activity pharmacologically drugs that may be used for this invention, (1) peptide (an insulin, a growth hormone, and interferon.) Calcitonin, urokinase, coagulation factor-VIII, coagulation factor IX, the compound for target delivery to the scarce compound and/or the specific organ, or system of (2) bioavailabilities like erythropoietin (the nafillin.) Vincristine, the cefazolin, the doxorubicin, quinine, chloroquine, Like a primaquine, d-**-tocopherol (it is also an anti-oxidant), and gentamycin, (3) It is predominantly combined with serum protein after absorption, and/or biotransformation is promptly carried out in liver, the

compound (the glyburide and indomethacin.) which this shows scarce bioactive Like oxyphenbutazone, a chlorothiazole, propranolol, and cyclophosphamide, And a thing (it is (like physostigmine, fluoxetine, and Verden)) with the neuropharmacology substance imitating the self-sustaining intravenous injection of (4) compounds and the capability to pass a blood brain barrier film preferably is included. The passage which will be clear to a person skilled in the art depends for selection of the drugs (singular number or plurality) used on conditions, the disease with which it deals, the illness, or the therapy which should be used. Especially, in a suitable embodiment, said peptide is an insulin and said constituent is used for a diabetic therapy. In especially suitable embodiment with one [another] more, these drugs are vincristine and this constituent is used for cancer treatment. The quantity of activity drugs may be pharmacologically determined by the person skilled in the art depending on the character of material, and the use meant.

[0010]

These activity pharmacologically drugs are provided as a solution of the core in the fatty acid content film of the pro micell of this invention. This core solution may be a micro emulsion or a liposome. A suitable micro emulsion is indicated by US,5,665,700,B to Cho and others, and the indication is used among this Description. This micro emulsion contains this activity pharmacologically material together with phospholipid preferably under existence of a surface-active agent. This micro emulsion may contain a hydrophilic liquid, a solvent, protein inhibitor, a stabilizing agent, emulsification acid, and preservatives further. This micro emulsion may be prepared by mixing or those mixing following preparation of a hydrophilic phase and a lipophilic phase, and use of a micro liquifier.

[0011]

A suitable liposome is indicated by US,5,656,289,B to Cho and others, and the indication is used among this Description. This liposome contains the continuation hydrophilic phase containing the hydrophilic phase which has an activity material pharmacologically preferably and cholesterol, phospholipid, a lipophilic surfactant, and unesterified fatty acid. This liposome may be prepared by mixing the above-mentioned ingredient.

[0012]

Phospholipid in this micro emulsion or a liposome, desirable -- water solubility or miscibility phospholipid (glycerophosphate.) They are glycerophosphorylcholine, phosphorylcholine, glycerophosphorylethanolamine, phosphorylethanolamine, ethanolamine, glycerophosphorylserine, glycero phosphoryl glycerol, etc.

[0013]

Again this phospholipid Soluble phosphorus lipid, for example, sn-1 **ASHIRU** 3 **GURI cello phosphate, sn-1,2 **JIA sill glycerol, a sn-1 **ASHIRU** glycero phosphoryl choline, sn-1 **JIASHI roux glycerol phosphate, sn-1 **JIASHIRU** 3 **GURISERO phosphoryl ethanol amine, sn-1, a 2 **ASHIRU** 3 **GURI cello phosphorylserine, sn-1, 2 **ASHIRU** 3 **GURISE low phosphate, sn-1 **ASHIRU** 3 **GURISERO (glecero) phosphoryl glycerol, sn-1, 2 **JIA sill glycerophosphate, a 1 **MIRISUTOIRU** sn **GURISERO** 3 **HOSUHO choline, 1 myristoyl sn **GURISERO** 3 **HOSUHO ethanolamine, 1 **MIRISUTOIRU** sn **GURISERO** 3 **HOSUHO** (N, N **JIMECHIRU) **ETA Norian amine, A 1 **PARUMITOIRU (palmytoyl)-sn **GURISERO** 3 **HOSUHO choline (or ethanolamine), A 1 **PARUMITOIRU** rac **GURISERO** 3 **HOSUHO choline, 1 **PARUMITOIRU** sn **GURISERO** 3 **HOSUHO** (N, N **JIMECHIRU) **ETA Norian amine, 1

stearoyl sn **GURISERO** 3 **HOSUHO (phosph) Kolin. And they may be these mixtures.

[0014]

This micro emulsion or a liposome contains desirable oleic acid and other fatty acid less than 5 volume % or this (recinoleic acid, linolic acid, etc.). These fatty acid may be saturation or an unsaturation. In a suitable embodiment, these fatty acid is unsaturated.

[0015]

The encapsulation of this micro emulsion or the liposome is carried out by the intermediate layer containing esterification saturation C₁₂ - C₁₈ fatty acid. These fatty acid may be combined with glycerol or lecithin. These C₁₂ - C₁₈ fatty acid could be extracted from the coconut. This intermediate layer is about 0.02 nm in thickness preferably.

[0016]

Further, the encapsulation of this intermediate layer is carried out with a film film, and he may provide a mini capsule. This film film may contain gelatin preferably, and may also contain glycerol and hydroxymethyl cellulose further. This mini capsule may be packed into a gelatine capsule.

[0017]

The fatty acid concentration (arbitrary fatty acid in said core is included) in all the constituents is less than 15 weight %.

[0018]

In a suitable embodiment, this mini capsule has a size of about 1.8 mm - 3 mm.

[0019]

The constituent of this invention prepares this micro emulsion or the core solution of a liposome, adds these esterification C₁₂ - C₁₈ fatty acid, and is manufactured by subsequently covering with a film film. This micro emulsion or a liposome uses a fluid bed or the same equipment (SPIR-A-FLOW of Freund Co. and Ltd. (Tokyo, Japan), etc.), for example, By carrying out spraying covering on carriers (inactive hydroxypropylcellulose powder etc.), it may be made a solid powder form.

[0020]

This core solution is covered with the intermediate layer of esterification C₁₂ - C₁₈ fatty acid, subsequently multiplex nozzle devices (SPHEREX-LABO (registered trademark) of Freund Co. and Ltd., etc.) are used for it, and film covering may be carried out. In a suitable embodiment, the core solution which contains activity drugs pharmacologically, Use SPHEREX-LABO (registered trademark) and on 5.5 and the frequency of 20Hz/second. By being vibrated and injected at the 5-ml rate of flow for /, and making it vibrate on vibration of 7.4, and the frequency of 20Hz/second, It is covered with C₁₂ of a coconut (350g) and soybean lecithin (150g) origin - the interlayer layer of C₁₈ fatty acid, And film covering is carried out with the solution containing gelatin (118.7g), glycerol (19.4g), sodium hydroxide (5.5g), hydroxymethylcellulose (56.4g), and water (100g). The mini capsule obtained as a result is promptly hardened by being dropped into the pipe (1.5 ml - 2.0 ml) which has a size of 1.8 mm - 3.0 mm (an average of 2 mm), and contains a cold circulating plant oil.

[0021]

This hardened mini capsule is collected and washed on a collection network, and vegetable oil is removed, and it is made to dry at 25 ** overnight. These dry mini capsules are put in the ** gelatine capsule of #1 or #2, contain the insulin of 16U or 8U, respectively, and have the total weight of 16.44 mg / capsule. This suitable

preparation thing is summarized as follows.

[0022]

[Table 1]

[0023]

Said pro micell content mini capsule (5% (weight/volume) of C₁₂ - C₁₈ fatty acid are contained), When the Homo sapiens subject is medicated, it is protected from acid pH in the stomach by the enteric film of this mini capsule, and since sizes are 1.8 mm - 3.0 mm, the pylorus is passed easily and it goes to the duodenum. In intestines, fatty acid of this interlayer increases by exposure to fatty acid, and it increases more than 15 weight %, and reverses from this pro micell to micell (in stability and a living body, it is available).

[0024]

In activity drugs, the constituent of this invention is pharmacologically useful, the mammals and although it sends Homo sapiens preferably. these mammals for which activity drugs need delivery of these drugs with the form of the enteric capsule pharmacologically -- it is preferably administered orally to Homo sapiens. In a suitable embodiment, these activity pharmacologically drugs are insulins.

[0025]

As for all the document quoted in this Description, the whole is used in this Description.

[0026]

The following un-restrictive embodiments serve to illustrate this invention further.

[Working example]

[0027]

[Embodiment 1]

The insulin content compound which can administer a liquid orally is prepared as follows: All the chemicals used in this embodiment and other embodiments are the things of the object for analysis, or the grade for chemistry.

[0028]

The sub mixture A is prepared by dissolving the following ingredients in 95% ethanol (about 20 ml) at 40 ** during a water bath. :

Monooleic acid glycerol (1.5g-5.0g, preferably 2.8g-3.2g),

Lecithin (0.5g-6.0g, preferably 3.0g-3.5g),

Cholesterol (2g-8g, preferably 2.8g-4.6g),

phosphatidic acid (0.05g-0.97g, preferably 0.15g-0.33g) -- and

Soluble phosphatidylcholine (0g-20g, preferably 3.2g-9.8g).

[0029]

An anti-oxidant solution is prepared by dissolving the following ingredients in 95% ethanol (100 ml). :

Propyl gallate (5g-25g, preferably 10g-18g),

Butylated hydroxyanisole (3g-30g, preferably 8g-14g),

Butylated hydroxytoluene (5g-45g, preferably 10g-20g).

[0030]

The sub mixture B is an ingredient of the following in 95% ethanol (@150ml) in 40 ** during a water bath. :

Polyoxyethylene 40 **SUTEA rate (0.9g-5.8g, preferably 1.5g-3.9g);

Oleic acid (15.2g-66.5g, preferably 36.5g-48.9g);

Propylparaben (0.89 mg - 2.58 mg, preferably 92 mg - 118 mg);

Ascorbic acid (58 mg - 290 mg, preferably 92 mg - 121 mg);

Anti-oxidant (52 mg - 380 mg, preferably 200 mg - 340 mg);

Alpha-tocopherol (0.9g-5.6g, preferably 2.0g-3.9g);

Methylparaben (482 mg - 988 mg, preferably 580 mg - 720 mg);

Sub mixture A (12g-48g, preferably 19g-37g);

By dissolving, it is prepared, may be made 210 g by ethanol 95%, and mixes.

[0031]

:insulin (the capsule of #4 size containing this about 125-mg insulin content mini capsule -- 8U.) prepared when the sub mixture C dissolves the following ingredients in 35 ml of 95% ethanol And sufficient amount of insulins to give 16U to the capsule of #2 size containing this about 250-mg insulin content mini capsule, And aprotinin (sufficient kallikrein inactivation agent unit (KIU) to prevent the biodegradation by the insulin dialytic ferment in in vivo of the insulin of the quantity specified above, a peptidase (peptidase), etc.). For example, the aprotinin equal to about 1,200,000 KIU(s) is attached and added to about 343,200 units of swine insulins. These two ingredients are mixed and pH is adjusted to about 2.4 by adding (an) dark citric acid solution. Subsequently, N-acetyl neuraminic acid (0.8g-2.5g, preferably 0.9g-1.8g) is added, and dissolve and in some case, In order to fill up the screening effect of the neuraminic acid to an emission factor (clearing factors) so that it may be indicated by US,4,837,028,B, cyclohexylurea (the invalid dosage [. on clinical] of that, such as glipizide, for example, 0.05 mg) is added. All the ingredients are thoroughly dissolved by fixed stirring, and it is made 70 ml by ethanol 95%.

[0032]

The sub mixture D is prepared by dissolving the following ingredients in about 50 ml of water at 40 ** during a water bath. :

Polio xylene 40 **SUTEA rate (0.5g-2.4g, preferably 0.88g-2.55g),

Hydroxypropylcellulose (2.55g-9.89g, preferably 3.08g-7.04g),

Sodium benzoate (4.8g-14.9g, preferably 8.69g-12.48g).

And 70 ml is used with water.

[0033]

The sub mixture B (210 ml), the sub mixture C (70 ml), the sub mixture D (70 ml). And mix oleic acid (5weight % of the sub mixture B, C, and D of these), and a micro liquefaction machine (Micro-fluidic Co., Newton, Mass., U. S. A.) is used, In about 100,000-200,000-psi shearing force, an insulin content micro emulsion is manufactured the cold and by carrying out and carrying out micro liquefaction once. An encapsulation is carried out by the intermediate layer of the film which was able to do this insulin content micro emulsion with esterification C₁₂ from a coconut and lecithin - C₁₈ saturated fatty acid (43.5 volume %; specific gravity 0.918), The mini capsule (size of about 1.8 mm - 3.2 mm) containing a core insulin content micro emulsion (32.61 volume %; specific gravity 0.92) is used, The encapsulation of this is further carried out with gelatin (118.7g), glycerin (17.4g), NaOH (5.5g), HP-55 (56.4g), and water (600g) (the outside film layer of 23.77 volume %; specific gravity 1.262). Each mini capsule contains the insulin of about 0.01414 ml and the abbreviation 0.6U respectively. The dosage of the insulin contained to this mini

capsule may be adjusted or changed if needed.

[0034]

[Embodiment 2]

The sub mixture A is prepared by dissolving the following ingredients and subsequently to 100 ml carrying out by 95% ethanol into the 95% ethanol of about 60.

Polyoxyethylene 40 **SUTEA rate (1g-7g, preferably 3.5g-4.6g);
Sodium benzoate (0.4g-5.4g, preferably 1.8g-3.2g);
Aprotinin (as being indicated in the Embodiment 1);
NONUROSAMIN acid (Nonulosaminic acid) (0.05g-6.0g, preferably 0.4g-1.0g);
Sodium benzoate (0.5g-5.8g, preferably 1.8g-4.2g);
Hydroxypropylcellulose (3.8g-14.2g, preferably 5.4g-8.8g).

[0035]

The sub mixture B is prepared by making it a last volume of 100 ml by ethanol 95% by dissolving an insulin as in Embodiment 1, and dark citrate and ascorbic acid adjusting pH to 2.4.

[0036]

The sub mixture C is prepared by mixing the sub mixture A (100 ml) and the sub mixture B (100 ml).

[0037]

Sub mixture D :

125 ml of 95% ethanol is heated at 35 ** - 40 **, and they are the following ingredients. :

Cholesterol (2g-21g, preferably 12g-21g),
Glycero phosphatidylcholine (3.72g-14.65g, preferably 7.68g-11.05g),
Alpha-tocopherol (0.05g-2.5g, preferably 0.2g-0.9g),
Glycero monooleate (6.5g-18.3g, preferably 11.42g-16.92g),
It is prepared by cooling to a room temperature by dissolving soluble phosphatidylcholine (0g-20g, preferably 3.2g-9.8g).

[0038]

Sub mixture E :

A 127.2-ml MCT (trademark) (inside chain triglyceride, Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN.) oil is heated at 35-40 **, and they are the following ingredients. :

Tween-80 (0.3g-37g, preferably 0.8-2.1g),
Propylparaben (0.05g-5.2g, preferably 0.08-0.3g),
Methylparaben (0.05g-3.8g, preferably 0.8-1.7g),

It is prepared by cooling to a room temperature by making it dissolve (as indicated by the above-mentioned Embodiment 1), and mixing well an anti-oxidant (0.08g-1.8g, preferably 0.8g-1.9g).

[0039]

The sub mixture F is prepared by mixing the sub mixture D and cooling to a room temperature.

[0040]

The last compound is prepared by adding the sub mixture C into the sub mixture F by fully uniforming with oleic acid of 5 volume % (the sub mixture C and the sub mixture F), stirring uniformly.

[0041]

The insulin content solution obtained as a result was used as about 3-mm mini capsule so that it might be indicated in the Embodiment 1.

[0042]

[Embodiment 3]

It is a total (five persons are the 2 type NIDDM diabetics who had not answered oral medication of every day of sulfonylurea (for example, glyburide), and two persons are 1 type IDDM diabetics) of seven insulin antibody negative diabetics. Although age was 35-63 years old (47.3 years old of average age), and four persons of them were males and three persons were women, after submitting the consent document of a document, it was accommodated in the research center.

[0043]

Although the supper of the standard diabetic diet was taken out to previous night 6:00PM of an experiment day - 6:30PM by these patients and the patient of these abstained from food after that to them overnight, water was given freely. 6:00AM of an experiment day -- each patient -- the insulin content mini capsule (per weight of 1 kg about insulin of 0.5U - 0.8U) of the form of Embodiment 1 -- 300 ml -- although it was warm, to take with the water which is not hot was asked. 0 hour after 4 hours' having collected blood the venous blood sample for every hour and taking an insulin by taking orally for measurement of a blood glucose level, the blood serum insulin level was measured at time 1.5 hours and 2.5 hours after. A result is shown in Table I, drawing 4, and drawing 5.

[0044]

[Table 2]

[0045]

Blood sugar decreased in number on the permissible level clinically gradually, and, on the other hand, the blood serum insulin level increased from the insulin deficiency state (insulinopenic) per about 168micro per ml in these diabetics as shown in drawing 4 and drawing 5. The hypoglycemia or hyperinsulinemia of the critical grade was observed [in / no / the example]. Such knowledge After the subcutaneous

injection of the insulin in these diabetics, and the liposome of the oral insulin of a therapy dosage or a micro emulsion joint compound (US,5,665,700,B.) It differs from the response of blood sugar and a blood serum insulin level usually observed intentionally after the administration indicated to US,4,849,227,B and US,5,656,289,B. Generally the relative more quick start of the pharmacological action in the fall of a blood sugar level this knowledge, Except for having been observed with this new pro micell compound, it is dramatically similar with the clinical data found out after administration of the oral insulin of the micell form indicated to US,5,858,398,B.

[0046]

[Embodiment 4]

In the swine (a male, 70 kg) under anesthesia, the duodenum was exposed by abdominal median-line incision, and the cannula measures of the greatest main lymphatic ducts discharged from this duodenum were taken. Lymph was collected into the extensive glass cylinder for [of an experiment / in a whole period / every] 15 minutes. Catheter with one [another] more was inserted all over the portal vein, and portal vein venous blood was extracted for [of this experiment / in a period / every] 15 minutes. The insulin content mini capsule (about 2500 mg containing the swine insulin of 160U) as indicated in the Embodiment 2 was immersed into 50 ml of cold buffer solution in pH about 2.8 overnight, and was used as the "emulsion", and this was poured in into the duodenum within 5 minutes through the catheter. The bile style was not barred between this procedure.

[0047]

This lymph (it dilutes to 1 / 10 - 1/50), and these serum samples, It analyzed about insulin concentration using the assaying method developed by this invention persons, and checked by the radioactivity immunoassay method of this bioassay method or Novo-Nordisk Diagnostics, LTD, Cambridge, and U. K. Drawing 6, drawing 7, and drawing 8 show hepatic portal vein blood, lymph, and the insulin concentration in peripheral venous blood, respectively.

[0048]

From earlier research (US,5,858,398,B to Cho). A micell joint insulin is absorbed in superior from a gastrointestinal tract system via a monoglyceride course, and. Via a portal vein venous system. . Being led into liver was shown. (Clark, B & Hubscher, G., Nature 185: 35, 1960 ; Imai, Y. & Sakagami, T.; in Lipid Biochemistry, pp. 111-126, 1966, Asakura Shoten, Tokyo, Japan. Some of oral insulin in the compound of this invention poured in into the duodenum this research with a swine. It was found out in portal vein blood, the insulin of the significant more high concentration poured in into the duodenum was found out in the duodenum lymph by which cannula measures were taken within 15 to 30 minutes of this medication, and it was proved that some of those were found out in peripheral venous blood.

[0049]

[Embodiment 5]

Generally the micro emulsion was used as that core, and the capsule containing the insulin of this pro micell form was prepared as indicated in the Embodiment 1. Each capsule contained the cow insulin of 4.3U. One capsule was administered orally to intravenous glucose load 15 quota of 250 mg/kg by both sex (three males, scalpel of two birds) at each of five White Rabbit with a weight of 2.1 kg - 2.5 kg. Water was used as control. Internal use of this pro micell insulin compound intercepted effectively the hyperglycemia derived by intravenous glucose administration as shown in drawing 9. It is blood glucose Folin et al. and J. Bio. Chem. 38 : It measured

by the method of 81 and 1919.

[0050]

Drawing 10 shows blood glucose when intraperitoneal (i. p.) administration of the extract (it is 2.5 ml about 0.4 IU/ml) of a standard usual insulin solution (it is 0.3 ml about 3.1 IU/ml) or this pro micell is carried out to a rabbit at glucose load 15 quota of 250 mg/kg. i.p. injection of the standard usual insulin decreased blood sugar. i.p. injection of the compound of this invention containing very a small amount of sialic acids and cyclohexylurea embellished effectively the hypoglycemia derived by the insulin. This suggests that a sialic acid and cyclohexylurea intercept the phagocytic activity of a reticuloendothelial system (the peritoneum, liver, a spleen, the kidney, and a lung are included) and phagocyte (monocyte and a lymphocyte are included).

[0051]

Drawing 11 shows a blood glucose level when intravenous (i. v.) injection of the extract (it is 1.5 ml about 0.4 IU/ml) of a standard usual insulin (it is 0.2 ml about 3.1 IU/ml) or this pro micell is carried out to a rabbit at glucose load 1 quota of 250 mg/kg. In the standard usual insulin, blood glucose decreased quickly in 20 minutes - 45 minutes, subsequently it was less than 90 minutes of this insulin injection, and it increased gradually until it became 10% - 30% of the levels of control. The hypoglycemia effect had short temporal duration. In the compound of this invention, the hypoglycemia effect was accepted within 35 minutes, and continued during the experiment for 120 minutes or more. usually, the start came out more slowly rather than the insulin, and the period was longer.

[Brief Description of the Drawings]

[0052]

[Drawing 1]The encapsulation of drawing 1 is carried out in 27-micrometer-thick C₁₂-C₁₈ fatty acid layer, and it is a microphotograph of the insulin content micell (about 0.0141 ml) further covered with the thin layer of the gelatin film.

[Drawing 2]The encapsulation of drawing 2 is carried out in 27-micrometer-thick C₁₂-C₁₈ fatty acid layer, and it is the microphotograph of an insulin content micro emulsion (about 0.0141 ml) further covered with the thin layer of the gelatin film.

[Drawing 3]The encapsulation of drawing 3 is carried out in 27-micrometer-thick C₁₂-C₁₈ fatty acid layer, and it is a microphotograph of the insulin content liposome (about 0.0141 ml) further covered with the thin layer of the gelatin film.

[Drawing 4]Drawing 4 is a graph describing the blood glucose level in the diabetic after administration of the compound of Embodiment 1.

[Drawing 5]Drawing 5 is a graph describing the serum concentration of the insulin in the diabetic after administration of the compound of Embodiment 1.

[Drawing 6]Drawing 6 is a graph describing the insulin concentration in hepatic portal vein blood after pouring in the duodenum of the pro micell compound of this invention.

[Drawing 7]Drawing 7 is a graph describing the insulin concentration in lymph after pouring in the duodenum of the pro micell compound of this invention.

[Drawing 8]Drawing 8 is a graph describing the insulin concentration in peripheral venous blood after pouring in the duodenum of the pro micell compound of this invention.

[Drawing 9]Drawing 9 is the graph which drew the increase in blood glucose after carrying out intravenous (i. v.) administration of the glucose on the rabbit.

[Drawing 10]Drawing 10 is a graph which compares the blood glucose which answered intraperitoneal (i. p.) administration of the standard usual insulin and the compound of this invention.

[Drawing 11] Drawing 11 is a graph which compares the blood glucose which answered i.v. administration of the standard usual insulin and the compound of this invention.

[Claim 1]

A constituent in which it is a constituent containing a core which contains activity drugs pharmacologically, and the encapsulation of this core is carried out by a film containing esterification C₁₂ - C₁₈ fatty acid, and this fatty acid concentration in this constituent is less than 15 weight %.

[Claim 2]

The constituent according to claim 1 in which said core is a micro emulsion or a liposome.

[Claim 3]

The constituent according to claim 2 in which said micro emulsion contains phospholipid and a surface-active agent.

[Claim 4]

The constituent according to claim 2 in which said liposome contains a continuation hydrophilic phase containing said hydrophilic phase which contains activity drugs pharmacologically and cholesterol, phospholipid, a lipophilic surfactant, and unesterified fatty acid.

[Claim 5]

Pharmacologically said activity drugs An insulin, a growth hormone, interferon, Calcitonin, urokinase, coagulation factor-VIII, coagulation factor IX, Erythropoietin, nafcillin, vincristine, cefazolin, doxorubicin, Quinine, chloroquine, a primaquine, d-**-tocopherol, gentamycin, The constituent according to claim 1 which is glyburide, indomethacin, oxyphenbutazone, a chlorothiazole, propranolol, cyclophosphamide, physostigmine, fluoxetine, or Verden.

[Claim 6]

Said constituent according to claim 1 whose activity drugs are insulins pharmacologically.

[Claim 7]

The constituent according to claim 1 in which said C₁₂ - C₁₈ fatty acid are extracted from a coconut.

[Claim 8]

The constituent according to claim 1 in which said film is a thickness of about 0.02 mm.

[Claim 9]

The constituent according to claim 1 in which the encapsulation of said film is further carried out with a film film.

[Claim 10]

The constituent according to claim 9 in which said film film contains gelatin.

[Claim 11]

The constituent according to claim 9 which is a mini capsule which has a diameter of about 1.8-3.0 mm.

[Claim 12]

The constituent according to claim 11 further covered with enteric coating.

[Claim 13]

The following processes :

(a) A process of providing a liposome or a micro emulsion which contains activity

drugs pharmacologically,

(b) A process of covering this liposome or a micro emulsion with an intermediate

layer containing esterification C₁₂ - C₁₈ saturated fatty acid,

(c) A method of covering this intermediate layer with a film layer, and including a process of providing a mini capsule of manufacturing a constituent which contains activity drugs pharmacologically.

[Claim 14]

A method according to claim 13 of including further a process of encapsulating said mini-capsule in a gelatine capsule.

[Claim 15]

A method according to claim 13 of said liposome or a micro emulsion having in a form in the end of dried powder.

[Claim 16]

A way according to claim 13 said mini-capsule has a diameter of about 1.8-3.0 mm.

[Claim 17]

A method of sending activity drugs pharmacologically to these mammals including administering a constituent of Claim 1 orally to the mammals.

[Claim 18]

A way according to claim 17 said mammals are Homo sapiens.

PA05-599
reference 17

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508938
(P2005-508938A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. 7

F 1

テーマコード(参考)

A61K 38/28

A61K 37/26

4C076

A61K 9/107

A61K 9/107

4C084

A61K 9/127

A61K 9/127

A61K 9/14

A61K 9/14

A61K 9/48

A61K 9/48

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-533898 (P2003-533898)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月5日 (2002.9.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月9日 (2004.4.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/028159
 (87) 國際公開番号 WO2003/030865
 (87) 國際公開日 平成15年4月17日 (2003.4.17)
 (31) 優先権主張番号 09/974,942
 (32) 優先日 平成13年10月11日 (2001.10.11)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

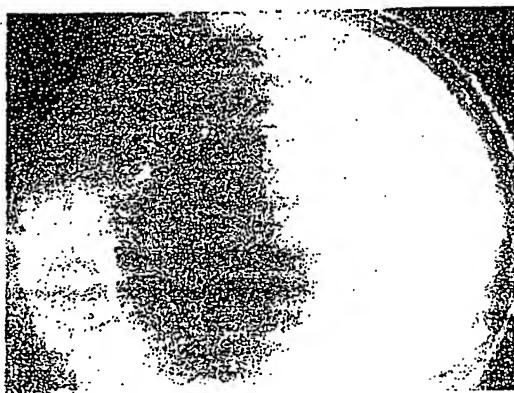
(71) 出願人 504142260
 アイエムアイ・バイオメド・インコーポレ
 イテッド
 1 M I B I O M E D, I N C.
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州、フレ
 モント、エヌ-37、スティーブンソン、
 ブールバード 3400
 3400 Stevenson Bou
 levard, N-37, Fremont,
 CA 94538 U. S. A.
 (74) 代理人 100057874
 弁理士 曾我道照
 (74) 代理人 100110423
 弁理士 曾我道治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プロミセル薬学的組成物

(57) 【要約】

本発明は、エステル化C₁₂～C₁₈脂肪酸の膜で被包された薬学的に活性な薬剤を含む、プロミセル組成物を提供する。哺乳類の腸管中では、C₁₂～C₁₈脂肪酸への曝露は結果的に、該プロミセルを安定なミセルへと変換し、これはこの薬学的に活性な薬剤を、全身循環へ効果的に送達する。本発明は、このような組成物を製造し使用する方法を、更に提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬学的に活性な薬剤を含有する核を含む組成物であって、該核はエステル化 C_{1,2} ~ C_{1,8} 脂肪酸を含む膜で被包され、該組成物中の該脂肪酸濃度は 15 重量%未満である、組成物。

【請求項 2】

前記核はミクロエマルジョンまたはリポソームである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ミクロエマルジョンはリン脂質および界面活性剤を含有する、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記リポソームは、前記薬学的に活性な薬剤を含有する親水相、ならびにコレステロール、リン脂質、親油性界面活性剤および未エステル化脂肪酸を含有する連続親水相を含有する、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記薬学的に活性な薬剤は、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロン、カルシトニン、ウロキナーゼ、凝固因子ⅧⅢⅩ、凝固因子Ⅸ、エリスロポエチン、ナフシリン、ビンクリスチシン、セファゾリン、ドキソルビシン、キニーネ、クロロキン、ブリマキン、d-α-トコフェロール、ゲンタマイシン、グリブリド、インドメタシン、オキシフェンブタゾン、クロロチアゾール、プロプラノロール、シクロホスファミド、フィゾスチグミン、フルオキセチン、またはフェルデンである、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

前記薬学的に活性な薬剤はインシュリンである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 C_{1,2} ~ C_{1,8} 脂肪酸はココナッツから抽出される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記膜は約 0.02 mm の厚さである、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

前記膜はさらにフィルム被膜で被包される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1.0】

前記フィルム被膜はゼラチンを含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 1.1】

約 1.8 ~ 3.0 mm の直径を有するミニカプセルである、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 1.2】

腸溶コーティングでさらに被覆される、請求項 1.1 に記載の組成物。

【請求項 1.3】

以下の工程：

(a) 薬学的に活性な薬剤を含有するリポソームまたはミクロエマルジョンを提供する工程と、

(b) 該リポソームまたはミクロエマルジョンを、エステル化 C_{1,2} ~ C_{1,8} 鮑和脂肪酸を含む中間層で被覆する工程と、

(c) 該中間層をフィルム層で被覆し、ミニカプセルを提供する工程とを含む、薬学的に活性な薬剤を含む組成物を製造する方法。

40

【請求項 1.4】

前記ミニカプセルをゼラチンカプセル中にカプセル化する工程をさらに含む、請求項 1.3 に記載の方法。

【請求項 1.5】

前記リポソームまたはミクロエマルジョンは乾燥粉末形態にある、請求項 1.3 に記載の方法。

【請求項 1.6】

50

前記ミニカプセルは約1.8~3.0mmの直径を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

請求項1の組成物を哺乳類に経口投与することを含む、該哺乳類に薬学的に活性な薬剤を送達する方法。

【請求項18】

前記哺乳類はヒトである、請求項17に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【発明の背景】

10

特定の薬学的に活性な薬剤の経口配合物は、哺乳類への投与に統いて分解および不適切な吸収の対象となる。経口投与された活性な薬剤の安定性およびバイオアベイラビリティを改善するための試みがなされてきた。例えば、リポソームおよびミセルが、薬物キャリアとして使用されてきた。例えば、Burkeに対する米国特許第5,552,156号、Allenに対する米国特許第4,837,028号を参照。Choに対する米国特許第4,849,227号は、乳化剤および界面活性剤からなる粒子を含む経口投用組成物を開示しており、ここで活性な薬剤は該粒子の表面に結合しており、かつ該粒子は脂質被膜で被覆されている。Choらに対する米国特許第5,665,700号は、生物活性材料を含有する親水相を含む配合物を開示しており、ここで該親水相は親油相中で分散してエマルジョンを形成する。Choに対する米国特許第5,858,398号は、活性な薬剤の微粒子、リン脂質、および界面活性剤を含む配合物を開示しており、ここで該微粒子は、ミセルに懸濁している。

20

【背景技術】

【0002】

Nakagameらに対する米国特許第4,615,885号は、ウロキナーゼおよび高級脂肪酸、ポリアルキレングリコール、ならびにカルシウムを含むリポソーム調製物を開示している。Nakagameらは、リン脂質がラメラ構造中に残るような濃度にて、リポソーム膜中へ高級脂肪酸を組込むことを開示している。該膜中の脂肪酸濃度は、好ましくは5重量%~15重量%である。より高濃度では、その中心に該脂肪酸を有するミセルの形成を結果的にもたらし、そしてNakagameによれば、それにより前記組成物の該薬物を運搬する能力が低減または除かれるであろう。

30

【0003】

ミセルは薬物送達系として既知であるが、一般に不安定であり、この活性な薬剤の該ミセルからの分離を結果的にもたらす。界面活性剤、トリグリセリド、および脂質一界面活性剤混合ミセルを適用することによる、インシュリンおよび他の巨大分子の腸からの吸収を促進する試みは、一般に芳しくない結果となってきた。Muranishi et al. (1978) J. Pharm. Dyn. 1: 28; Inouye et al. (1979) J. Pharm. Dyn. 2: 286; Danforth et al. (1980) J. Pharm. Dyn. 4: 219; Crane et al. (1968) Diabetes 17: 625。

30

【0004】

米国特許第5,858,398号は、in vitroでの親水性コレステロールおよびリン脂質の添加によるミセルの安定化を開示している。

40

【0005】

本発明によると、薬学的に活性な薬剤のC₁₂~C₁₈脂肪酸層でのカプセル化がプロミセルを形成し、これは哺乳類への投与に際して安定なミセルを提供することが発見された。該プロミセルは、この薬学的に活性な薬剤を効果的に送達し、かつin vitroでのコレステロールおよびリン脂質での安定化を必要としない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

【発明の概要】

50

本発明は、C₁₂～C₁₈脂肪酸の膜内にカプセル化された薬学的に活性な薬剤を含み、さらに随意にゼラチンカプセル内にカプセル化される組成物を提供する。哺乳類の腸において、C₁₂～C₁₈脂肪酸への曝露は、薬学的に活性な薬剤を全身循環中へ効果的に送達する安定ミセルのin vivo形成を結果的にもたらす。本発明は、そのような組成物を製造し使用する方法を、さらに提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

[発明の詳細な説明]

本発明は、エステル化C₁₂～C₁₈脂肪酸の膜内に被包された薬学的に活性な薬剤を含み、さらに随意に、ゼラチンカプセル内に被包される薬学的組成物を提供する。脂肪酸は、該組成物が「プロミセル」の形態にあるようにするために、該組成物中15重量%未満の合計濃度で存在する。本明細書中で使用される用語プロミセルは、ミセルを形成するには不十分であるが、哺乳類の消化器系中で脂肪酸に曝露する際にミセルを形成する能力がある濃度のC₁₂～C₁₈脂肪酸を有する組成物を意味する。特に、哺乳類への投与に際して、該プロミセルは、脂肪酸の全体積百分率が15%を超えるように腸内で脂肪酸に曝露され、そして該プロミセルがミセルを形成する。

10

【0008】

in vivoで本発明のプロミセルからミセルを形成することにより、この薬学的に活性な薬剤の全身循環への送達が提供される。ミセルを有する薬剤は、モノグリセリド経路を介して腸管吸収系により容易に吸収され、一方リポソーム形態のままである任意のプロミセル中の薬剤は、ホスフェート系を介して吸収される。本発明によると、プロミセルの形態で経口投与により送達されたインシュリンは、十二指腸に排出されるリンパ液中に見出され（米国特許第5,656,289号のリポソームおよび米国特許第5,665,700号のマイクロエマルジョンと同様）、ならびに肝臓中に流れ込む門脈血中に見出された（米国特許第5,858,398号の安定化剤ミセルと同様）。したがって、送達は、インシュリン注射の際に観測されるものと同様である。特に、まさに脾臓のβ細胞から内分泌されたプロインシュリンが送達されるように、インシュリンは、本発明の配合物により肝臓へ送達される。

20

【0009】

薬学的に活性な薬剤は、ペプチド、糖タンパク質、有機および無機化学物質、草本、および薬学的に活性な薬剤として有用であることが当業界で既知の他の材料を包含するが、これらに限定されない。特に、本発明に用いられてもよい薬学的に活性な薬剤は、（1）ペプチド（インシュリン、成長ホルモン、インターフェロン、カルシトニン、ウロキナーゼ、凝固因子VIII、凝固因子IX、エリスロポエチンのような）、（2）バイオアベイラビリティの乏しい化合物および/または特定の器官もしくは系への標的送達用化合物（ナフシリン、ビンクリスチン、セファゾリン、ドキソルビシン、キニーネ、クロロキン、ブリマキン、d-α-トコフェロール（抗酸化剤でもある）、およびゲンタマイシンのような）、（3）吸収後、血清タンパク質に優勢に結合され、および/または肝臓にて迅速に生体内変換され、それにより乏しい生物活性を示す化合物（グリブリド、インドメタシン、オキシフェンブタゾン、クロロチアゾール、プロプラノロール、シクロホスファミドのような）、および（4）化合物の持続静脈内注入を模倣する神経薬理学物質、好ましくは血液脳関門膜を通過する能力があるもの（フィゾスチグミン、フルオキセチン、およびフェルデンのような）を包含する。当業者に明らかであろうとおり、用いられる薬剤（単数または複数）の選択は、条件、処置される疾患または疾病、または用いられるべき治療に依存する。特に好適な実施形態において、前記ペプチドはインシュリンであり、前記組成物は糖尿病の治療用に用いられる。もう1つ別の特に好適な実施形態において、該薬剤はビンクリスチンであり、そして該組成物は癌治療に用いられる。薬学的に活性な薬剤の量は、材料の性質および意図される使用に依存し、そして当業者により決定される。

30

【0010】

40

50

この薬学的に活性な薬剤は、本発明のプロミセルの脂肪酸含有膜内の核の溶液として提供される。この核溶液は、ミクロエマルジョンまたはリポソームであってもよい。好適なミクロエマルジョンは、Choらに対する米国特許第5,665,700号に開示され、その開示は本明細書中援用される。該ミクロエマルジョンは、好ましくは、界面活性剤の存在下でリン脂質と合わせてこの薬学的に活性な材料を含有する。該ミクロエマルジョンは、さらに、親水性液体、溶媒、タンパク質阻害剤、安定化剤、乳化酸、保存料を含有してもよい。該ミクロエマルジョンは、混合により、または親水相および親油相の調製に続くこれらの混合により、およびミクロ液化器の使用により、調製されてもよい。

【0011】

好適なリポソームは、Choらに対する米国特許第5,656,289号に開示され、その開示は、本明細書中援用される。該リポソームは、好ましくは、薬学的に活性な材料を有する親水相、ならびにコレステロール、リン脂質、親油性界面活性剤および未エステル化脂肪酸を含有する連続親水相を含有する。該リポソームは、上記の成分を混合することにより調製されてもよい。

【0012】

該ミクロエマルジョンまたはリポソーム中のリン脂質は、好ましくは、水溶性または混和性リン脂質（グリセロホスフェート、グリセロホスホリルコリン、ホスホリルコリン、グリセロホスホリルエタノールアミン、ホスホリルエタノールアミン、エタノールアミン、グリセロホスホリルセリン、およびグリセロホスホリルグリセロールなど）である。

【0013】

該リン脂質はまた、溶解性リン脂質、例えばsn-1-アシル-3-グリセロホスフェート、sn-1,2-ジアシルグリセロール、sn-1-アシル-グリセロホスホリルコリン、sn-1-ジアシルグリセロールホスフェート、sn-1-ジアシル-3-グリセロホスホリルエタノールアミン、sn-1,2-アシル-3-グリセロホスホリルセリン、sn-1,2-アシル-3-グリセロホスフェート、sn-1-アシル-3-グリセロ（glecero）ホスホリルグリセロール、sn-1,2-ジアシルグリセロホスフェート、1-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-（N,N-ジメチル）エタノールアミン、1-パルミトイyl（palmytoyl）-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（またはエタノールアミン）、1-パルミトイyl-rlac-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイyl-sn-グリセロ-3-ホスホ-（N,N-ジメチル）エタノールアミン、1ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホ(phosph)コリン、およびこれらの混合物などであってもよい。

【0014】

該ミクロエマルジョンまたはリポソームは、好ましくは5体積%またはこれより少ないオレイン酸および他の脂肪酸（リシノール酸およびリノール酸など）を含有する。これらの脂肪酸は、飽和または不飽和であってもよい。好適な実施形態において、これらの脂肪酸は不飽和である。

【0015】

該ミクロエマルジョンまたはリポソームは、エステル化飽和C₁₂～C₁₈脂肪酸を含有する中間層で被包される。これらの脂肪酸は、グリセロールまたはレシチンと組合わされてもよい。これらのC₁₂～C₁₈脂肪酸は、ココナツから抽出されたものでもよい。該中間層は、好ましくは約0.02nmの厚さである。

【0016】

該中間層はさらに、フィルム被膜で被包されてミニカプセルを提供してもよい。該フィルム被膜は、好ましくはゼラチンを含み、そしてさらにグリセロールおよびヒドロキシルメチルセルロースを含んでもよい。該ミニカプセルは、ゼラチンカプセル中へ詰められてよい。

【0017】

全組成物中の脂肪酸濃度（前記核中の任意の脂肪酸を包含する）は、15重量%未満で

10

20

30

40

50

ある。

【0018】

好適な実施形態において、該ミニカプセルは約1.8mm～3mmの大きさを有する。

【0019】

本発明の組成物は、該ミクロエマルジョンまたはリポソームの核溶液を調製し、これらのエステル化C₁₂～C₁₈脂肪酸を加え、次いでフィルム被膜により被覆することにより製造される。該ミクロエマルジョンまたはリポソームは、例えば、流動床または同様な装置(Freund Co., Ltd. (東京、日本)のSPIR-A-LOWなど)を使用して、キャリア(不活性ヒドロキシプロピルセルロース粉末など)上に噴霧被覆することにより、固体粉末形態にされてもよい。

10

【0020】

該核溶液は、エステル化C₁₂～C₁₈脂肪酸の中間層で被覆され、次いで多重ノズル装置(Freund Co., Ltd.のSPHEREX-LABO(登録商標)など)を使用して、フィルム被覆されてもよい。好適な実施形態において、薬学的に活性な薬剤を含有する核溶液は、SPHEREX-LABO(登録商標)を使用して、5.5および20Hz/秒の周波数で、5ml/分の流速にて振動かつ噴射され、7.4の振動および20Hz/秒の周波数で振動させることにより、ココナッツ(350g)および大豆レシチン(150g)由来のC₁₂～C₁₈脂肪酸の中間膜層で被覆され、そしてゼラチン(118.7g)、グリセロール(19.4g)、水酸化ナトリウム(5.5g)、ヒドロキシメチルセルロース(56.4g)および水(100g)を含有する溶液でフィルム被覆される。この結果得られるミニカプセルは、1.8mm～3.0mm(平均2mm)の大きさを有し、そして冷たい循環植物油を含有する1.5ml～2.0mlの管中へ滴下することで迅速に硬化される。

20

【0021】

この硬化したミニカプセルを収集網上で集め、洗って植物油を除去し、そして25℃にて一晩乾燥させる。これらの乾燥したミニカプセルは、#1または#2の軟ゼラチンカプセル中に入れられ、そしてそれぞれ16Uまたは8Uのインシュリンを含有し、そして16.44mg/カプセルの合計重量を有する。この好適な調製物は、以下のとおり要約される。

30

【0022】

【表1】

	重量%	SpGrv	体積%	20 Hz/秒	ミニカプセル
核	30	0.92	32.63	5.5	3.8 mg [23.1%]
中間層	40	0.918	43.59	7.4	7.65mg [46.5%]
フィルム	30	1.262	23.78	16.9	4.99mg [30.4%]

【0023】

前記プロミセル含有ミニカプセル(5%(重量/体積)のC₁₂～C₁₈脂肪酸を含有)は、ヒト被検者に投与される場合、該ミニカプセルの腸溶性フィルムにより胃での酸性pHから保護され、そして大きさが1.8mm～3.0mmであるため、容易に幽門を通過して十二指腸へ行く。腸において、脂肪酸への曝露によりこの中間膜の脂肪酸が増加して15重量%よりも多くなって、該プロミセルからミセル(安定かつ生体において利用可能である)へと逆転する。

40

【0024】

本発明の組成物は、薬学的に活性な薬剤を哺乳類、および好ましくはヒトへ送達するのに有用である。この薬学的に活性な薬剤は、腸溶性カプセルの形態で、該薬剤の送達を必要としている哺乳類、好ましくはヒトに、経口投与される。好適な実施形態において、この薬学的に活性な薬剤はインシュリンである。

【0025】

本明細書中で引用される全ての文献は、その全体が本明細書中で援用される。

50

【0026】

以下の非限定的な実施例は、さらに本発明を例示する働きをする。

【実施例】

【0027】

[実施例1]

液体の経口投与可能なインシュリン含有配合物は、以下のとおり調製される。この実施例および他の実施例中で使用される全ての化学物質は、分析用または化学用グレードのものである。

【0028】

サブ混合物Aは、水浴中40°Cにて95%エタノール(約20ml)中で以下の成分を溶解することにより調製される:

モノオレイン酸グリセロール(1.5g~5.0g、好ましくは2.8g~3.2g)

レシチン(0.5g~6.0g、好ましくは3.0g~3.5g)、

コレステロール(2g~8g、好ましくは2.8g~4.6g)、

ホスファチジン酸(0.05g~0.97g、好ましくは0.15g~0.33g)、
および

溶解性ホスファチジルコリン(0g~20g、好ましくは3.2g~9.8g)。

【0029】

抗酸化剤溶液は、95%エタノール(100ml)中で以下の成分を溶解させることにより調製される:

没食子酸プロピル(5g~25g、好ましくは10g~18g)、

ブチル化ヒドロキシアニソール(3g~3.0g、好ましくは8g~14g)、

ブチル化ヒドロキシトルエン(5g~45g、好ましくは10g~20g)。

【0030】

サブ混合物Bは、水浴中40°Cにて95%エタノール(@150ml)中で以下の成分:

ポリオキシエチレン-40-ステアレート(0.9g~5.8g、好ましくは1.5g~3.9g);

オレイン酸(15.2g~66.5g、好ましくは36.5g~48.9g);

プロピルパラベン(0.89mg~2.58mg、好ましくは92mg~118mg);

アスコルビン酸(58mg~290mg、好ましくは92mg~121mg);

抗酸化剤(52mg~380mg、好ましくは200mg~340mg);

α -トコフェロール(0.9g~5.6g、好ましくは2.0g~3.9g);

メチルパラベン(48.2mg~98.8mg、好ましくは58.0mg~72.0mg);

サブ混合物A(12g~48g、好ましくは19g~37g);

を溶解することにより調製され、95%エタノールで210gにしてよく混合する。

【0031】

サブ混合物Cは、35mlの95%エタノールに以下の成分を溶解することにより調製される:インシュリン(約125mgのこのインシュリン含有ミニカプセルを含有する#4サイズのカプセルに8U、および約250mgのこのインシュリン含有ミニカプセルを含有する#2サイズのカプセルに16Uを与えるのに十分なインシュリン量)、およびアプロチニン(上記に特定される量のインシュリンの、in vivoでのインシュリン分解酵素、ペプチド分解酵素(ペプチダーゼ)などによる生分解を防ぐのに十分なカリクレイン不活化剤単位(KIU))。例えば、約120万KIUに等しいアプロチニンが、ブタインシュリン約343,200単位につき加えられる。これらの2成分を混合し、そして(an)濃クエン酸溶液を加えることによりpHを約2.4に調整する。次いで、N-アセチルノイタミン酸(0.8g~2.5g、好ましくは0.9g~1.8g)が加えられて溶解され、そして幾つかの場合では、米国特許第4,837,028号により記載され

10

20

30

40

50

るよう、排出因子 (clearing factors) に対するノイラミン酸の遮断効果を補充するために、シクロヘキシル尿素 (グリピジドなど、それのわずかで臨床上無効な用量、例えば 0.05 mg) が加えられる。一定の攪拌により全成分を完全に溶解し、そして 95% エタノールで 70 ml にする。

【0032】

サブ混合物 D は、水浴中 40 °C にて約 50 ml の水に以下の成分を溶解することにより調製される：

ポリオキシレン-40-ステアレート (0.5 g ~ 2.4 g、好ましくは 0.88 g ~ 2.55 g)、

ヒドロキシプロピルセルロース (2.55 g ~ 9.89 g、好ましくは 3.08 g ~ 7.04 g)、

安息香酸ナトリウム (4.8 g ~ 14.9 g、好ましくは 8.69 g ~ 12.48 g)

そして水で 70 ml にする。

【0033】

サブ混合物 B (210 ml)、サブ混合物 C (70 ml)、サブ混合物 D (70 ml)、およびオレイン酸 (これらのサブ混合物 B、C、および D の 5 重量%) を混合し、そしてミクロ液状化器 (Micro-fluidic Co.、Newton, Mass., U. S. A.) を使用して、約 100,000 ~ 200,000 psi の剪断力にて、冷やして一度ミクロ液状化することにより、インシュリン含有ミクロエマルジョンを製造する。該インシュリン含有ミクロエマルジョンを、ココナツ油およびレシチンからのエステル化 C₁₂ ~ C₁₈ 鮑和脂肪酸 (43.5 体積%；比重 0.918) でできた膜の中間層で被包され、核インシュリン含有ミクロエマルジョン (32.61 体積%；比重 0.92) を含有するミニカプセル (約 1.8 mm ~ 3.2 mm の大きさ) にし、これはさらに、ゼラチン (118.7 g)、グリセリン (17.4 g)、NaOH (5.5 g)、HP-55 (56.4 g)、および水 (600 g) で被包される (23.77 体積% の外側フィルム層；比重 1.262)。各ミニカプセルは、各々約 0.01414 ml および約 0.6 U のインシュリンを含有する。該ミニカプセルに含有されるインシュリンの用量は、必要に応じて調整または変更され得る。

20

30

【0034】

【実施例 2】

サブ混合物 A は、約 60 の 95% エタノール中に以下の成分を溶解し、次いで 95% エタノールで 100 ml することにより調製される：

ポリオキシエチレン-40-ステアレート (1 g ~ 7 g、好ましくは 3.5 g ~ 4.6 g)；

安息香酸ナトリウム (0.4 g ~ 5.4 g、好ましくは 1.8 g ~ 3.2 g)；

アプロチニン (実施例 1 に記載されるとおり)；

ノヌロサミン酸 (Nonulosaminic acid) (0.05 g ~ 6.0 g、好ましくは 0.4 g ~ 1.0 g)；

安息香酸ナトリウム (0.5 g ~ 5.8 g、好ましくは 1.8 g ~ 4.2 g)；

ヒドロキシプロピルセルロース (3.8 g ~ 14.2 g、好ましくは 5.4 g ~ 8.8 g)。

40

【0035】

サブ混合物 B は、実施例 1 におけるようにインシュリンを溶解し、そして濃クエン酸およびアスコルビン酸で pH を 2.4 に調整し、そして 95% エタノールで 100 ml の最終体積により調製される。

【0036】

サブ混合物 C は、サブ混合物 A (100 ml) とサブ混合物 B (100 ml) とを混合することにより調製される。

【0037】

50

サブ混合物Dは：

125mlの95%エタノールを35℃～40℃に加熱し、そして以下の成分：
 コレスチロール(2g～21g、好ましくは12g～21g)、
 グリセロホスファチジルコリン(3.72g～14.65g、好ましくは7.68g～11.05g)、
 α-トコフェロール(0.05g～2.5g、好ましくは0.2g～0.9g)、
 グリセロモノオレエート(6.5g～18.3g、好ましくは11.42g～16.92g)、
 溶解性ホスファチジルコリン(0g～20g、好ましくは3.2g～9.8g)を溶解させ、そして室温に冷却することにより、調製される。

10

【0038】

サブ混合物Eは：

127.2mlのMCT(商標)(中鎖トリグリセリド、Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN.)油を35～40℃に加熱し、そして以下の成分：
 Tween-80(0.3g～37g、好ましくは0.8～2.1g)、
 プロピルパラベン(0.05g～5.2g、好ましくは0.08～0.3g)、
 メチルパラベン(0.05g～3.8g、好ましくは0.8～1.7g)、
 抗酸化剤(0.08g～1.8g、好ましくは0.8g～1.9g)(上記の実施例1で記載されるとおり)を溶解させ、よく混合し、そして室温に冷却することにより、調製される。

20

【0039】

サブ混合物Fは、サブ混合物Dを混合して室温に冷却することにより調製される。

【0040】

一定に攪拌しながら、サブ混合物Cをサブ混合物F中に加え、そして5体積%(サブ混合物Cおよびサブ混合物F)のオレイン酸と十分に均質化することにより、最終配合物を調製する。

30

【0041】

この結果得られるインシュリン含有溶液を、実施例1に記載されるように約3mmのミニカプセルにした。

【0042】

【実施例3】

合計7人のインシュリン抗体陰性糖尿病患者(5人はスルホニル尿素(例えばグリブリド)の毎日の経口投薬に応答していなかった2型NIDDM糖尿病患者であり、そして2人は1型IDDM糖尿病患者)で、年齢は35～63歳(平均年齢47.3歳)、そのうち4人は男性であり、そして3人は女性であったが、書面の同意書を提出の上で研究センターに収容された。

40

【0043】

これらの患者には、実験日の前夜6:00PM～6:30PMに標準糖尿病食の夕食が出され、その後これらの患者は一晩絶食したが、ただし水は自由に与えられた。実験日の6:00AMに、各患者は実施例1の形態のインシュリン含有ミニカプセル(体重1Kgあたり約0.5U～0.8Uのインシュリン)を、300mlの温かいが熱くない水と共に服用するように求められた。血中グルコースレベルの測定のため、静脈血試料を4時間の間1時間ごとに採血し、そして経口でインシュリンを服用した0時間後、1.5時間後、および2.5時間後の間に、血清インシュリンレベルを測定した。結果を表Iならびに図4および図5に示す。

【0044】

【表2】

表I

P T S	年 齢	性 別	血中グルコース (mMol/L)					インシュリンの 血清濃度(uU/M)		
			0	1	2	3	4	0	1.5	2.5時間
1	44	女	10.5	10.3	5.8	6.6	6.7	9.8	141	160.4
2	35	女	8.9	8.2	3.7	6	4.9	11.4	46.5	201
3	40	男	11.1	9.5	8.2	5	5.8	13.7	87.6	186.6
4	55	男	9.2	8.2	5.7	5.1	4.2	7.9	76.9	179.1
5	56	女	8.6	8.1	6.2	5.4	3.8	14	88	108
6	63	男	7.8	6.9	5.8	4.7	4.8	26	72	161.9
7	38	男	6.2	5.9	6.1	4.5	4.5	22.2	83.1	179
平均	47.29	4男 3女	8.90	8.16	5.93	5.33	4.96	15.00	85.01	168.00
平均 値の 標準 偏差	10.67		1.64	1.48	1.31	0.74	0.99	6.66	28.50	29.93

10

20

30

40

50

【0045】

図4および図5に示されるとおり、血糖は徐々に臨床的に許容可能なレベルに減少し、一方血清インシュリンレベルはこれらの糖尿病患者において、インシュリン欠乏状態 (insulinopenic) から1ml当たり約168μ单位に増加した。どの例においても、重篤な程度の低血糖または高インシュリン血症は観測されなかった。そのような知見は、これらの糖尿病患者でのインシュリンの皮下注射後、および治療用量の経口インシュリンのリボソームまたはミクロエマルジョン結合配合物（米国特許第5,665,700号、米国特許第4,849,227号、および米国特許第5,656,289号に記載される）の投与後に、血糖および血清インシュリンレベルの通常観測される応答と有意に異なる。この知見は、一般に、血糖レベルの低下における薬理作用の相対的により速い開始が、この新規プロミセル配合物で観測されたことを除いて、米国特許第5,858,398号に記載されるミセル形態の経口インシュリンの投与後に見い出された臨床データと大いに類似している。

【0046】

[実施例4]

麻酔下のブタ（オス、70Kg）において、腹部の正中線切開により十二指腸を露出させ、そして該十二指腸から排出する主要な最大のリンパ管をカニューレ処置した。実験の全期間中15分間ごとに、リンパ液を大量ガラスシリンドラー中へ収集した。もう1つ別のカテーテルを門脈中に挿入し、そして門脈静脈血を該実験の期間中15分間ごとに採取した。実施例2に記載されるとおりのインシュリン含有ミニカプセル（約160Uのブタインシュリンを含有する2500mg）を、pH約2.8にて50mlの冷緩衝溶液中に一晩浸漬して「乳濁液」にし、これをカテーテルを通じて5分以内で十二指腸中へ注入した。胆汁流は、この手順の間妨げられなかった。

【0047】

該リンパ液（1/10～1/50に希釈）およびこれらの血清試料を、本発明者らにより開発されたアッセイ法を使用してインシュリン濃度について分析し、そしてこのバイオアッセイ法またはNovo-Nordisk Diagnostics, LTD, Cambridge, U.Kの放射能免疫アッセイ法により確認した。図6、図7、および図8は、それぞれ肝門脈血、リンパ液、および末梢静脈血中のインシュリン濃度を示す。

【0048】

より早い研究 (Choに対する米国特許第5, 858, 398号) から、ミセル結合インシュリンはモノグリセリド径路を介して胃腸管系から優勢的に吸収され、そして門脈静脈系を介して肝臓中へ導かれることが示された (Clark, B & Hubscher, G., Nature 185: 35, 1960 ; Imai, Y. & Sakagami, T., in Lipid Biochemistry, pp. 111-126, 1966, Asakura Shoten, Tokyo, Japan)。ブタでの本研究は、十二指腸中へ注入された本発明の配合物中の経口インシュリンの幾つかが、門脈血中に見いだされ、十二指腸中へ注入された有意により高い濃度のインシュリンが、この投薬の15~30分以内にカニューレ処置された十二指腸リンパ液中で見いだされ、そしてそれの内の幾つかが、末梢静脈血中で見いだされたことを実証した。

10

【0049】

【実施例5】

このプロミセル形態のインシュリンを含有するカプセルを、一般的にその核としてミクロエマルジョンを使用して、実施例1に記載されるとおりに調製した。各カプセル剤は、4.3Uのウシインシュリンを含有した。250mg/kgの静脈内グルコース負荷15分前に、両方の性別（3羽のオス、2羽のメス）で2.1kg~2.5kgの体重の5羽の白ウサギの各々に、1つのカプセルを経口投与した。コントロールとして水を使用した。図9に示されるとおり、このプロミセルインシュリン配合物の経口投与は、静脈内グルコース投与により誘導される高血糖を効果的に遮断した。血中グルコースを、Folin et al., J. Bio. Chem. 38: 81, 1919の方法により測定した。

20

【0050】

図10は、250mg/kgのグルコース負荷15分前に、ウサギに標準通常インシュリン溶液（3.1IU/mlを0.3ml）または該プロミセルの抽出物（0.4IU/mlを2.5ml）が腹腔内（i.p.）投与された場合の、血中グルコースを示す。標準通常インシュリンのi.p.注射は、血糖を減少させた。極少量のシアル酸およびシクロヘキシル尿素を含有する本発明の配合物のi.p.注射は、インシュリンにより誘導された低血糖を効果的に修飾した。このことは、シアル酸およびシクロヘキシル尿素が、細網内皮系（腹膜、肝臓、脾臓、腎臓、および肺を含む）および食細胞（単球およびリンパ球を含む）の食作用活性を遮断することを示唆する。

30

【0051】

図11は、250mg/kgのグルコース負荷1分前に、ウサギに、標準通常インシュリン（3.1IU/mlを0.2ml）または該プロミセルの抽出物（0.4IU/mlを1.5ml）が静脈内（i.v.）注射された場合の血中グルコースレベルを示す。標準通常インシュリンでは、血中グルコースは20分~45分で急速に減少し、次いでこのインシュリン注射の90分以内で、コントロールのレベルの10%~30%になるまで、徐々に增加了。低血糖効果は、持続時間が短かった。本発明の配合物では、低血糖効果は35分以内で認められ、そして120分以上の実験の期間中続いた。通常インシュリンよりもその開始はよりゆっくりで、そして期間はより長かった。

40

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、27μmの厚さのC₁₂~C₁₈脂肪酸層で被包され、そしてさらにゼラチン膜の薄層で被覆された、インシュリン含有ミセル（約0.0141ml）の顕微鏡写真である。

【図2】図2は、27μmの厚さのC₁₂~C₁₈脂肪酸層で被包され、そしてさらにゼラチン膜の薄層で被覆された、インシュリン含有ミクロエマルジョン（約0.0141ml）の顕微鏡写真である。

【図3】図3は、27μmの厚さのC₁₂~C₁₈脂肪酸層で被包され、そしてさらにゼラチン膜の薄層で被覆された、インシュリン含有リポソーム（約0.0141ml）の顕微鏡写真である。

50

【図4】図4は、実施例1の配合物の投与後の、糖尿病患者における血中グルコースレベ

ルを描いたグラフである。

【図5】図5は、実施例1の配合物の投与後の、糖尿病患者におけるインシュリンの血清濃度を描いたグラフである。

【図6】図6は、本発明のプロミセル配合物の十二指腸内注入後の、肝門脈血中のインシエリン濃度を描いたグラフである。

【図7】図7は、本発明のプロミセル配合物の十二指腸内注入後の、リンパ液中のインシュリン濃度を描いたグラフである。

【図8】図8は、本発明のプロミセル配合物の十二指腸内注入後の、末梢静脈血中のインシュリント濃度を描いたグラフである。

【図9】図9は、ウサギにグルコースを静脈内（i.v.）投与した後の、血中グルコースの増加を描いたグラフである。 10

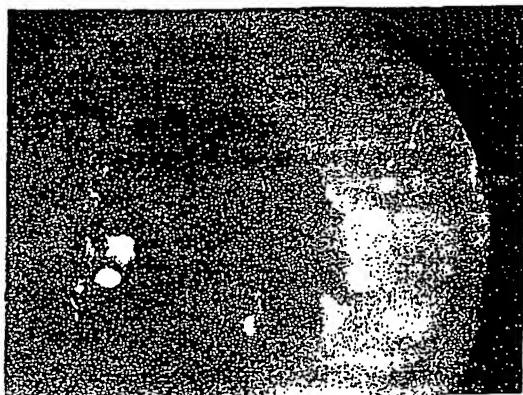
【図10】図10は、標準の通常インシュリンおよび本発明の配合物の腹腔内投与に応答した血中グルコースを比較するグラフである。

【図11】図11は、標準の通常インシュリンおよび本発明の配合物のi.v.投与に応答した血中グルコースを比較するグラフである。

〔図 1〕



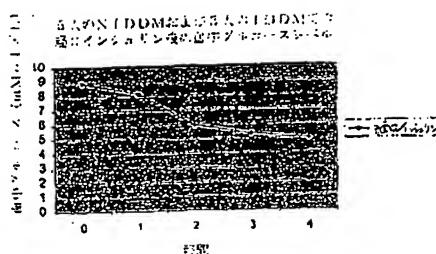
【図2】



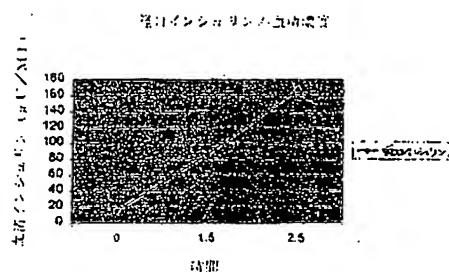
[四 3]



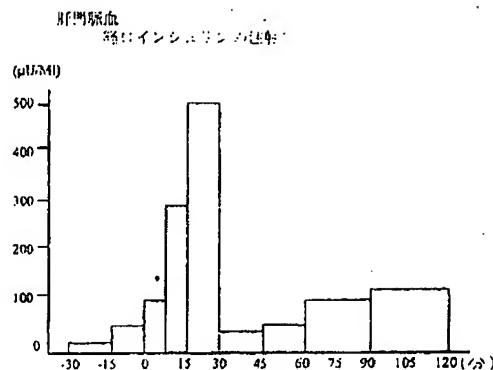
[图 4]



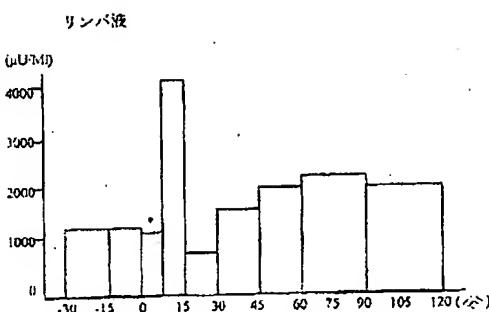
【図 5】



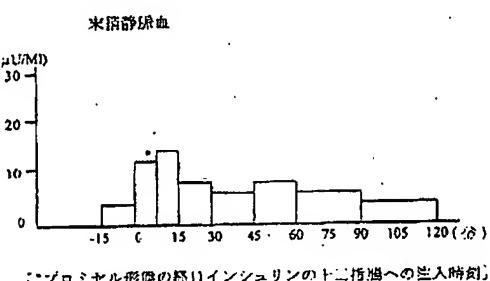
【図 6】



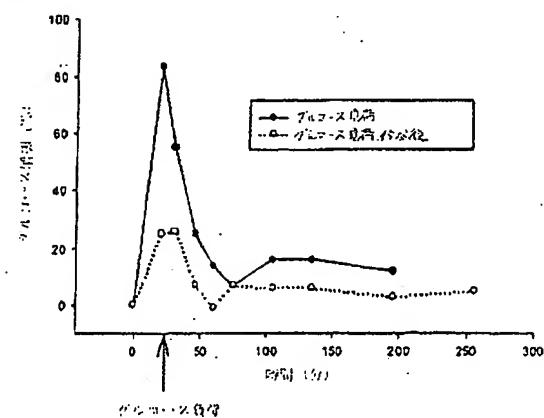
【図 7】



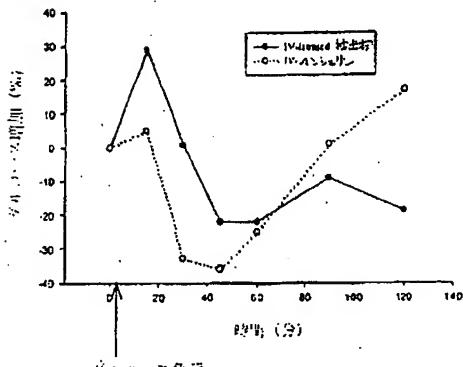
【図 8】



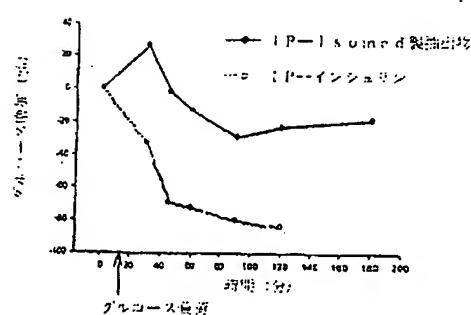
【図 9】



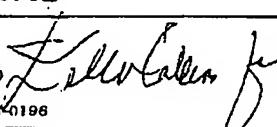
【図 11】



【図 10】



【國際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28159
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) A61K 9/127, 9/04, 9/16, 38/28; C07K 16/00. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/450, 455, 456, 498, 85.4, 94.1; 530/303, 308, 351, 383, 384, 399; 514/2, 3, 21.		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4,615,885 A (NAKAGAME et al) 07 October 1986, See the entire document.	1-5 and 8-18
X	US 4,849,227 A (CHO) 18 July 1989, See the entire document.	1-6, 8-9, 13 and 15-18
X	US 5,656,289 A (CHO et al) 12 August 1997, See the entire document.	1-6 and 8-18
Y		7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or can only be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 OCTOBER 2002	Date of mailing of the international search report 27 NOV 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (705) 305-5230	Authorized officer ABDEL A. MOHAMED  Telephone No. (705) 305-0198	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US02/28159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/450, 455, 456, 498, 85.4, 94.1; 550/503, 506, 551, 585, 584, 599; 514/2, 3, 21.

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, CAS ONLINE, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, AGRICOLA
search terms: micelle# or pro-micelle# or pro(a)micelle#; liposome#; microemulsion# or micro(a)emulsion#;
phospholipid# and (surfactant# or detergent#); cholesterol#, insulin#, growth hormone or GH, calcitonin#,
urokinase#, interferon#, cyclophosphamide#, gentamicin#.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷ F I テーマコード (参考)

A 61 K 47/14	A 61 K 47/14
A 61 K 47/24	A 61 K 47/24
A 61 K 47/42	A 61 K 47/42

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N, O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100084010

弁理士 古川 秀利

(74) 代理人 100094695

弁理士 鈴木 憲七

(74) 代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74) 代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72) 発明者 チョー、ヤング・ダブリュ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州、フレモント、エヌー37、スティーブンソン、ブルバード
3400

(72) 発明者 リー、キース・クワン-ホー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州、フレモント、エヌー37、スティーブンソン、ブルバード
3400

Fターム(参考) 4C076 AA17 AA19 AA29 AA53 AA95 BB01 CC30 DD37 DD45 DD46

DD63 DD70 EE42 FF34 FF43

4C084 AA02 AA03 BA44 DB34 MA05 MA22 MA24 MA37 MA43 MA52

NA11 NA13 ZC03 ZC35